

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОСВЯЗИ ПРОДУКЦИИ ПРОСТАГЛАНДИНА E2 И ЦИТОКИНОВ АДЕНОКАРЦИНОМЫ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И ЕЕ МИКРООКРУЖЕНИЕМ

Аутеншлюс А.И.^{1,2}, Архипов С.А.^{1,2}, Карпучина К.В.², Михайлова Е.С.^{1,2}, Могильная Е.Д.¹, Вараксин Н.А.³

¹ГБОУ ВПО «Новосибирский государственный медицинский университет», Новосибирск, e-mail: arhipowsergei@yandex.ru;

²Институт молекулярной биологии и биофизики, Новосибирск;

³ЗАО «Вектор-Бест», п. Кольцово, Новосибирская область

Целью работы явилось выявление и изучение взаимосвязи между спонтанной и стимулированной поликлональными активаторами (ПА) продукцией простагландина E2 (ПГЕ2) и цитокинов аденокарциномой молочной железы (АМЖ) и клетками ее микроокружения. Материалом исследования служили биоптаты опухолей 20 женщин с инвазивным протоковым раком молочной железы в возрасте от 40 до 60 лет. С помощью иммуноферментного анализа определяли концентрацию IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, IL-18, IL-1 β , IL-1Ra, TNF- α , IFN- γ , G-CSF, GM-CSF, VEGF-A, MCP-1 и концентрацию простагландина E2 (ПГЕ2). Установлено, что регуляторное воздействие ПГЕ2 на злокачественную прогрессию АМЖ может осуществляться посредством изменения регуляторного потенциала продукции следующих цитокинов (оцениваемого по величине индекса влияния ПА на их продукцию) в порядке убывания их вероятной значимости в простагландин-зависимой и цитокин-опосредованной регуляции прогрессии АМЖ: IL-18, IL-10, GM-CSF, VEGF-A, IL-1Ra, IL-6, G-CSF, IL-2 и IL-17. Полученные в работе данные дополняют и развивают концепцию о том, что при опухолевой прогрессии может формироваться достаточно автономная и лабильная цитокиновая сеть, взаимодействующая с опухолевым компартментом системы простагландинов, которая является одним из многокомпонентных регуляторов инвазии опухоли и формирования ее злокачественного потенциала.

Ключевые слова: простагландины, цитокины, поликлональные активаторы, аденокарцинома молочной железы.

A STUDY OF THE RELATIONSHIP OF THE PRODUCTION OF PROSTAGLANDIN E2 CYTOKINES BY ADENOCARCINOMA OF THE BREAST AND ITS MICROENVIRONMENT

Autenshlyus A.I.^{1,2}, Arkhipov S.A.^{1,2}, Karpukhina K.V.², Mikhailova E.S.^{1,2}, Mogilnaia E.D.¹, Varaksin N.A.³

¹Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russian Federation, e-mail: arhipowsergei@yandex.ru;

²Research Institute of Molecular Biology and Biophysics, Novosibirsk;

³Closed Joint Stock Company "Vector-Best", Koltsovo, Novosibirsk Region

The aim of this work was to identify and investigate the relationship between spontaneous and stimulated by polyclonal activators (PA) production of prostaglandin E2 (ПГЕ2) and cytokines by mammary adenocarcinoma (MAC) and cells of its microenvironment. The material consisted of biopsies of the tumours of 20 women with invasive ductal breast cancer, aged 40 to 60 years. The studies were carried out in compliance with the World Medical Association Declaration of Helsinki. Written informed consent to participate in the study was obtained from each of the patients, which specified open publication of the results presented as reports or otherwise. Using ELISA determined the concentration of IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, IL-18, IL-1 β , IL-1Ra, TNF- α , IFN- γ , G-CSF, GM-CSF, VEGF-A, MCP-1, the concentration of prostaglandin E2 (ПГЕ2). It is established that the regulatory impact ПГЕ2 malignant progression MAC can be done by changing the regulatory potential of the products of the following cytokines (as measured by the index of influence of PA on their products) in decreasing order of their likely significance in prostaglandin-dependent and cytokineproducing regulation of progression MAC: IL-18, IL-10, GM-CSF, VEGF-A, IL-1Ra, IL-6, G-CSF, IL-2 and IL-17. Obtained data complement and build on the concept that during tumor progression, can be formed sufficiently autonomous and labile cytokine network, interacting with the tumor compartment of the system of prostaglandins, which is one of the multi-component regulators of tumor invasion and the formation of its malignant potential.

Keywords: prostaglandins, cytokines, polyclonal activators, breast adenocarcinoma.

По современным представлениям, роль цитокинов и простагландинов в опухолевой прогрессии складывается из ряда сложных взаимодействий медиаторов между собой, а также с другими звеньями иммунитета. Простагландины и цитокины могут секретироваться как самой опухолью, так и клетками микроокружения опухоли, вызывая аутокринные и паракринные эффекты [3; 7; 14]. Показано, например, что выделяемые опухолью ИЛ-6 и ИЛ-8 экспрессируют ряд факторов, активирующих сигнальный каскад циклооксигеназы-2 (СОХ-2), участвующей в синтезе простагландинов Е, ускоряющих рост и метастазирование опухоли [6]. Установлено, что повышенная продукция ПГЕ2 увеличивает риск метастазирования рака молочной железы (РМЖ) в отдаленные органы, являясь важным звеном в диссеминации опухолевых клеток [4-6; 14]. В экспериментальных условиях обнаружено, что PGE2, синтезируемый при участии СОХ-2, может стимулировать продукцию факторов ангиогенеза клетками рака молочной железы, стимулируя тем самым формирование кровеносных сосудов и рост опухолевой ткани [9; 13]. Получены данные, указывающие на то, что гиперэкспрессия гена СОХ-2, стимулирующая продукцию ПГЕ2, способствует увеличению метастатического потенциала опухолевых клеток РМЖ человека через механизм активации таких цитокинов, как VEGF и ИЛ-6 [4]. Ряд авторов полагают, что PGE2 способствует образованию метастазов двумя путями: повышением миграционных способностей неопластических клеток и супрессией противоопухолевой иммунной защиты [12]. Имеются данные, указывающие на то, что PGE2, продуцируемый в опухоли и клетках ее микроокружения, подавляет гуморальный и клеточный звенья иммунного ответа: угнетает ответ Т-лимфоцитов на опухолевые антигены, супрессирует митоген-индуцированную пролиферацию Т-клеток и функциональную активность НК-клеток, угнетает цитотоксичность макрофагов [4]. Отмечается, что в механизме иммуносупрессивного действия PGE2 важным элементом является нарушение баланса цитокинов, обусловленное значительным усилением секреции ИЛ-10 макрофагами и лимфоцитами и одновременным ингибированием продукции ИЛ-12 в макрофагах [11; 15].

Как известно, биологическая активность простагландинов реализуется через их взаимодействие со специфическими рецепторами клеток-мишеней. Показано, что высокий уровень экспрессии PGE2 и его рецепторов EP1, EP2, EP3 в опухолевой ткани может регулировать способность опухолевых клеток к миграции и инвазии [4; 11]. Таким образом, простагландины группы Е (ПГЕ) могут влиять на многие стороны развития злокачественных опухолей в организме, в частности на пролиферацию и дифференцировку опухолей клеток, инвазивный рост опухолей и метастазирование, как при прямых воздействиях на клетки опухоли и клетки ее микроокружения, так и опосредованно, воздействуя на

иммунокомпетентные клетки, изменяя их активность и продукцию ими различных цитокинов.

Полученные к настоящему времени данные позволили выдвинуть концепцию, суть которой заключается в том, в процессе опухолевой прогрессии может формироваться достаточно автономная цитокиновая сеть [8], взаимодействующая с опухолевым компартментом системы простагландинов, которая является одним из многокомпонентных регуляторов роста злокачественной опухоли и ее метастазирования. Однако механизмы «работы» этой сети, механизмы ее регуляции простагландинами практически не изучены.

Целью нашей работы явилось выявление и изучение взаимосвязи между спонтанной и стимулированной поликлональными активаторами продукцией простагландина E₂ и цитокинов аденокарциномой молочной железы и клетками ее микроокружения.

Материалы и методы

Материалом исследования служили биоптаты опухолей 20 женщин, в возрасте от 40 до 60 лет, с инвазивным протоковым раком, являющимся по гистологическому типу аденокарциномой. Каждому пациенту была предоставлена информация о цели и методах исследования. От каждого пациента получено информированное согласие на проведение исследования, подписанное самим пациентом и заверенное врачом. Этический комитет Научно-исследовательского института молекулярной биологии и биофизики дал разрешение на проведение этого исследования. Патогистологическое исследование фиксированных опухолей проводилось патоморфологом на препаратах, окрашенных по стандартной методике гематоксилином и эозином. Для оценки цитокинпродуцирующего резерва опухоли и ее микроокружения применяли комплекс поликлональных активаторов (ПА), состоящий из фитогемагглютинина в концентрации 4 мкг/мл, конканавалина А в концентрации 4 мкг/мл и липополисахарида в концентрации 2 мкг/мл. В исследовании использовали стандартизованный набор реагентов «ЦИТОКИН-СТИМУЛ-БЕСТ» производства ЗАО «Вектор-Бест». Биоптаты опухолей, полученные методом трепанобиопсии [1; 2], объемом 8 мм³, получали специальным устройством и помещали в 2 стеклянных флакона, содержащих по 1 мл, в одном из которых находилась только питательная среда DMEM-F12 (спонтанная продукция), а в другом – раствор ПА в таком же объеме среды (продукция, индуцированная ПА). После инкубирования при 37 °С в течение 72 ч опухоль извлекали из среды и фиксировали в растворе формалина для дальнейших иммуногистохимических и патогистологических исследований. Для получения очищенного от клеток супернатанта оставшиеся клетки опухоли осаждали центрифугированием при 2000 об/мин, 15 мин. В супернатантах после осаждения клеток опухоли с помощью иммуноферментного анализа определяли концентрацию IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, IL-18,

IL-1 β , IL-1Ra, TNF- α , IFN- γ , G-CSF, GM-CSF, VEGF-A, MCP-1 (монокитарный хемотаксический протеин-1) с использованием наборов реагентов производства ЗАО «Вектор-Бест» и концентрацию простагландина E2 (ПГЕ2) с использованием набора реагентов производства корпорации «R&D Systems» (Кат. номер KGE004, США). Индекс влияния поликлональных активаторов (ИВПА) на продукцию ПГЕ2 и цитокинов опухолью [1; 2], а также клетками ее микроокружения высчитывали по формуле: ИВПА = А/Б, где А – уровень стимулированной поликлональными активаторами продукции цитокина и ПГЕ2, Б – уровень спонтанной продукции цитокина и ПГЕ2.

Статистическую обработку данных выполняли с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни. Значения показателей выражали в виде медианы – Me, нижнего и верхнего процентилей (25; 75). Корреляционные связи между исследуемыми показателями определяли по коэффициенту ранговой корреляции Спирмена (r) с его достоверностью (p).

Результаты и обсуждение

При оценке ИВПА на продукцию ПГЕ2 аденокарциномой молочной железы (АМЖ) и ее микроокружением была выявлена значительная вариабельность этого показателя у исследованных пациентов: от 0,33-1,25 (ингибирование или отсутствие выраженной стимуляции продукции ПГЕ2) до 3,75 (высокий уровень стимуляции продукции ПГЕ2 под действием ПА). Это позволило разделить исследуемых нами пациентов на две группы по уровню ПГЕ2-ответа АМЖ на стимуляцию ПА: I группа - низкоотвечающие на стимуляцию ПА, ИВПА на продукцию ПГЕ2: 1,25 и меньше, II группа - высокоотвечающие на стимуляцию ПА ИВПА на продукцию ПГЕ2: 1,26 и больше. Концентрации ПГЕ2 в супернатанте АМЖ при оценке спонтанной продукции составили соответственно в I и II группах 5386,44 и 3953,20 пг/мл (достоверность различий: p=0,033). Таким образом, установлено, что группе I с низким ИВПА на продукцию ПГЕ2 АМЖ отмечается относительно высокий исходный уровень продукции ПГЕ2 по сравнению с группой II, в которой исходный (без стимуляции ПА) уровень продукции ПГЕ2 был ниже. При оценке спонтанной и стимулированной ПА продукции биоптатами АМЖ были выявлены достоверные различия между I и II группами АМЖ только по нескольким цитокинам: IL-10, IL-18 и GM-CSF (таблица 1).

В группе I была повышена спонтанная продукция биоптатами АМЖ IL-18 и понижена - продукция GM-CSF по сравнению с группой II. При этом в группе I хотя и была повышена стимулированная ПА продукция GM-CSF, тем не менее уровень ее был достоверно ниже по сравнению с аналогичным показателем в группе II. Что касается продукции АМЖ и ее микроокружения IL-10, то хотя и не было получено достоверных различий по спонтанной продукции этого цитокина в сравниваемых группах, тем не менее под воздействием ПА

были получены достоверные различия между группами по концентрации этого цитокина.

Показатель продукции IL-10 в группе II превышал таковой в группе I более чем в 4 раза. При оценке ИВПА на продукцию цитокинов было выявлено различие между исследуемыми группами АМЖ только по IL-10. В связи с обнаруженными закономерностями представляло интерес исследование корреляционных связей по всем пациентам (включающим группы I и II) между ИВПА на продукцию ПГЕ2 и уровнем продукции ПГЕ2 без (спонтанная) и после стимуляции биоптатов ПА, с одной стороны, и уровнями продукции исследуемых цитокинов - с другой.

Таблица 1

Показатели спонтанной, стимулированной поликлональными активаторами (ПА) продукции цитокинов и ИВПА на продукцию цитокинов аденокарциномой молочной железы и ее микроокружением в исследуемых группах

Цитокины	Группы пациентов с АМЖ*		Достоверность различий (p)
	Группа I	Группа II	
	Спонтанная продукция цитокинов (пг/мл), Ме (25-75-й процентиль)		
IL-18	272,15 (111,90; 697,75)	66,90 (36,1; 106,82)	0,050
GM-CSF	12,6 (7,83; 22,00)	114,9 (30,92; 136,43)	0,005
	Стимулированная ПА продукция цитокинов (пг/мл), Ме (25-75-й процентиль)		
IL-10	15,80 (10,21; 22,54)	75,25 (28,43; 212,61)	0,041
GM-CSF	51,21 (14,63; 66,32)	156,7 (72,31; 291,52)	0,038
	ИВПА** на продукцию цитокинов, Ме (25-75-й процентиль)		
IL-10	0,95 (0,69; 1,17)	4,36 (2,03; 7,93)	0,018

Примечание. *АМЖ – аденокарцинома молочной железы, **ИВПА - индекс влияния поликлональных активаторов.

Было установлено, что показатели спонтанной продукции ПГЕ2 АМЖ имели корреляционную связь с показателем спонтанной продукции IL-2 ($r=0,52$, $p<0,05$). Выявлено, что показатели продукции ПГЕ2 АМЖ после стимуляции ПА имели обратную корреляционную связь с показателем стимулированной ПА продукции IL-1b ($r = -0,65$, $p<0,05$). Данные, полученные нами ранее, свидетельствовали о том, что ИВПА на продукцию тех или иных цитокинов позволяет выявить цитокинпродуцирующие резервы исследуемых биоптатов опухоли и ее микроокружения, позволяющих получать больше

информации о ее функциональной активности, связанной со злокачественной прогрессией [1; 2]. Проведенный корреляционный анализ показал, что ИВПА на продукцию ПГЕ2 АМЖ и ее микроокружением имеет прямые корреляционные связи с ИВПА на продукцию IL-10 ($r = 0,62$, $p < 0,05$), IL-1Ra ($r = 0,66$, $p < 0,05$) и VEGF ($r = 0,81$, $p < 0,05$). В качестве дополнительной оценки состояния цитокиновой сети был проведен анализ корреляционных связей «2-го уровня», а именно – связей ИВПА на продукцию IL-10, IL-1Ra и VEGF с другими цитокинами (таблица 2).

Таблица 2

Корреляционные связи ИВПА на продукцию цитокинов в супернатанте АМЖ*

ИВПА цитокинов		Коэффициент корреляции, r^{***}
IL-10	IL-2	0,617723
IL-10	IL-6	0,473684
IL-10	G-CSF	0,512281
IL-10	VEGF	0,880952
IL-1Ra	IL-2	0,472585
IL-1Ra	IL-17	0,545853

Примечание: *АМЖ – аденокарцинома молочной железы, **ИВПА - индекс влияния поликлональных активаторов, ***Коэффициенты корреляции r представлены при $p < 0,05$.

Следовательно, уровень резерва продукции ПГЕ2, оцениваемый по ИВПА на продукцию ПГЕ2 в супернатанте опухоли, зависящий от исходной спонтанной продукции ПГЕ2, при изменении уровней продукции IL-10, IL-1Ra и VEGF, может опосредованно влиять на продукцию самой опухоли и клетками ее микроокружения IL-2, IL-6, G-CSF, VEGF и IL-17 (таблица 2).

Ранее нами была выявлена прямая корреляционная связь между ИВПА на продукцию IL-18 опухолью и относительным содержанием в ней низкодифференцированных клеток, которое, в свою очередь, прямо коррелировало с числом нормальных и патологических митозов и степенью злокачественности [2]. Поскольку в исследованной нами группе АМЖ с низким показателем ИВПА на продукцию ПГЕ2 (группа I) и с высокой спонтанной продукцией ПГЕ2 была повышена продукция проонкогенного цитокина IL-18, то можно сделать вывод о том, что исходно высокий уровень продукции ПГЕ2 в АМЖ создает условия для ее прогрессии. В другой работе была изучена сопряженность ИВПА на продукцию цитокинов в супернатанте опухоли с ИВПА на экспрессию VEGF-A в опухоли, с патогистологическими параметрами и с маркером пролиферации Ki-67, которая позволила выявить: прямую корреляционную связь между ИВПА на продукцию опухолью и ее

микроокружением TNF- α , цитокина, участвующего в ангиогенезе, и степенью васкуляризации опухоли; между ИВПА на экспрессию VEGF-A (гистохимический показатель) и IL-10 и IL-2, а также отрицательную корреляционную связь между ИВПА IL-6, MCP-1 и Ki-67 [1]. Сопоставляя эти данные с данными, представленными в настоящей работе (таблица 2), можно сделать вывод, что регуляторное воздействие ПГЕ2 на злокачественную прогрессию АМЖ может осуществляться посредством изменения потенциала продукции (косвенно выявляемого по величине ИВПА) следующих цитокинов в порядке убывания их вероятной значимости в простагландин-зависимой и цитокин-опосредованной регуляции злокачественной прогрессии: IL-18, IL-10, GM-CSF, VEGF-A, IL-1Ra, IL-6, G-CSF, IL-2 и IL-17.

Заключение

Полученные в настоящей работе данные дополняют и развивают концепцию о том, что при опухолевой прогрессии может формироваться достаточно автономная и лабильная цитокиновая сеть, взаимодействующая с опухолевым компартментом системы простагландинов, которая является одним из многокомпонентных регуляторов злокачественного потенциала, реализуемого в инвазии опухоли и ее метастазировании. Исследование показало, что регуляторное воздействие ПГЕ2 на рост АМЖ и ее прогрессию может осуществляться благодаря продукции ряда цитокинов, к наиболее значимым из которых следует отнести IL-18, IL-10, GM-CSF и VEGF-A.

Список литературы

1. Архипов С.А., Михайлова Е.С., Кунц Т.А., Карпухина К.В., Могильная Е.Д., Соловьев К.А., Вараксин Н.А., Аутеншлюс А.И. Цитокинпродуцирующий резерв иммунокомпетентных клеток крови и инвазивного протокового рака, его взаимосвязь с патогистологическими и иммуногистохимическими параметрами злокачественного новообразования // Мед. иммунология. - 2016. - Т. 18. - № 5. - С. 399-498.
2. Кунц Т.А., Карпухина К.В., Михайлова Е.С., Маринкин И.О., Вараксин Н.А., Аутеншлюс А.И., Ляхович В.В. Влияние поликлональных активаторов на продукцию цитокинов клетками крови и злокачественных новообразований молочной железы // Доклады Академии наук. - 2016. - Т. 466, № 1. - С. 117-119.
3. Соснина А.В., Великая Н.В., Вараксин Н.А., Гришаев М.П., Аутеншлюс А.И. Роль цитокинов в патогенезе злокачественных новообразований // Новосибирск: ЗАО ИПП «Офсет», 2014. - 128 с.
4. Таипов М.А., Никифорова З.Н., Кудрявцев И.А., Арноцкая Н.Е., Шевченко В.Е. Опухоли женской репродуктивной системы: роль Sox-2 в регуляции метастатического

потенциала опухолевых клеток молочной железы человека // Опухоли женской репродуктивной системы. - 2014. - № 1. - С. 8-14.

5. Ashok V., Dash C., Rohan T.E. et al. Selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors and breast cancer risk // *Breast*. - 2011. - Vol. 20. - № 1. - P. 66–70.

6. Comen E., Norton L., Massague J. Breast cancer tumor size, nodal status, and prognosis: biology trumps anatomy // *J. Clin. Oncol.* - 2011. - Vol. 29. - № 19. - P. 2610–2612.

7. Grivennikov S., Greten F., Karin M. Immunity, Inflammation, and Cancer // *Cell*. - 2010. - Vol. 140. - № 6. - P. 883–899.

8. Levina V., Su Y., Nolen B., Liu X., Gordin Y., Lee M., Lokshin A., Gorelik E. Chemotherapeutic drugs and human tumor cells cytokine Network // *Int. J. Cancer*. - 2008. - Vol. 123. - № 9. - P. 2031–2040.

9. Masferrer J.L., Koki A., Seibert K. COX-2 inhibitors. A new class of angiogenic agents // *Ann. NY Acad. Sci.* - 1999. - Vol. 889. - P.84–86.

10. Reader J., Holt D., Fulton A. Prostaglandin E2 EP receptors as therapeutic targets in breast cancer // *Cancer Metastasis Rev.* - 2011. - Vol. 30. - № 3-4. - P. 449-463.

11. Sandra N., Ester P., Marie-Agnès P. et al. The DHEA metabolite 7β-hydroxyepiandrosterone exerts anti-estrogenic effects on breast cancer cell lines // *Steroids*. - 2012. - Vol. 77. - № 5. - P. 542–551.

12. Subbaramaiah K., Morris P.G., Zhou X.K. et al. Increased levels of COX-2 and prostaglandin E2 contribute to elevated aromatase expression in inflamed breast tissue of obese women // *Cancer Discov.* - 2012. - Vol. 2. - № 4. - P. 356–365.

13. Wang D., DuBios R.N. Cyclooxygenase 2-derived prostaglandin E2 regulates the angiogenic switch // *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. - 2004. - Vol. 101. - № 2. - P. 415–416.

14. Wang D., DuBios R.N. Prostaglandins and cancer // *Gut*. - 2006. - Vol. 55. - № 1. - P. 115–122.

15. Wang J., Xiao X., Zhang Y. et al. Simultaneous modulation of COX-2, p300, Akt, and Apaf-1 signaling by melatonin to inhibit proliferation and induce apoptosis in breast cancer cells // *J. Pineal. Res.* - 2012. - Vol. 53. - № 1. - P. 77–90.